LEUKOZYTENMORPHOLOGIE BEI PATIENTEN MIT LEUKÄMISCHEN ERKRANKUNGEN

Eine fluoreszenzmikroskopische Untersuchung

Josef Eberle

Diss. München
1984

Aus der Kinderpoliklinik der Universität München

Direktor: Professor Dr. H. Spiess

Leukozytenmorphologie bei Patienten mit leukämischen Erkrankungen.

Eine fluoreszenzmikroskopische Untersuchung.

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin

an der Luwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Josef Eberle

aus

München

1984

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter : Prof. Dr. H. J. Suschke

Mitberichterstatter : Prof. Dr. H. Spiess

Dekan : Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung : 26.04.1984

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

Herrn Professor Dr. H.J. Suschke, Kinderpoliklinik der Universität München, bin ich für die Oberlassung des Themas und die geduldige Unterstützung der vorliegenden Arbeit zu größtem Dank verpflichtet.

Für die reibungslose Zusammenarbeit mit dem Labor des Klinikums Rechts-der-Isar der TU München danke ich Frau Korte und ihren Mitarbeiterinnen.

I N H A L T

		Seite
EINLEITUNG		1
1.1	Material und Methode	3
1.2	Beschreibung der Granulozyten und mononukleären Zellen beim Gesunden	5
2.	ERGEBNISSE	7
2.1	Nach Diagnosen geordnet	7
2.1.1	Untersuchungen bei Patienten mit chronisch-myeloischer Leukämie	7
2.1.2	Untersuchungen bei Patienten mit chronisch-lymphatischer Leukämie	9
2.1.3	Untersuchungen bei Patienten mit akut-myeloischer Leukämie	10
2.1.4	Untersuchungen bei Patienten mit akut-lymphatischer Leukämie	10
2.2	Verdünnungsversuch	12
2.3	Neutrophile Granulozyten nach Chloroform-inkubation	13
3.	DISKUSSION	14
3.1	Klinische Wertigkeit	14
3.2	Die Auswirkungen verschiedener PIC-Konzentrationen auf das Zählergebnis	18
3.3	Chloroform	21
3.4	Oberflächenveränderungen bei mononukleären Zellen	24
ZUSAMMENFASSUNG		30
LITERATURVERZEICHNIS		31

EINLEITUNG

Die Unterschiede zwischen gesunden und malignen Zellen bilden den Hauptgegenstand zahlreicher zeitgenössischer Forschungsarbeiten in der Medizin. Auffällig häufig spielen dabei Funktionen der Zelloberfläche eine wichtige Rolle. Durch Zufall entdeckte man beim Vergleich von Blutausstrichen gesunder Personen mit solchen von Leukämiekranken, wenn die Färbung mit Pseudoisocyaninchlorid erfolgt war, ein verändertes Färbeverhalten der malignen Leukozyten. Pseudoisocyaninchlorid ist ein kationischer Fluoreszenzfarbstoff, mit dem sich polyanionische Matrizen in menschlichen Gewebszellen zur Darstellung bringen lassen. Mittels einer Reihe von Versuchen wurde geklärt, um welche Bestandteile es sich bei den spezifischen Pseudoisocyanin-Granula im Lymphozyten handelt. Bei enzymatischen Spaltungstests mit Ribonuclease, Neuraminidase und verschiedenen Mucopolysaccaridasen blieben die Granula erhalten. Erst Inkubation des Blutes mit Phospholipase C oder Behandlung mit Lipidlösungsmitteln wie Benzol oder Chloroform führte bei mononukleären Zellen (Lymphozyten und Monozyten) zu einer vollständigen Löschung der Granulierung. Daraus wurde geschlossen, daß es sich bei den Granula um membranständige Phospholipide handeln müsse. Nun zeigen mononukleäre Zellen von Gesunden beziehungsweise von Patienten mit nicht malignen hämatolo-

gischen Erkrankungen im peripheren Blut eine annähernd hundertprozentige Granulierung. Dagegen konnte bei ersten Vergleichen mit Leukämiekranken zum Teil eine deutliche Minderung des Prozentsatzes an granulierten Zellen beobachtet werden. Um diesen ersten Eindruck zu überprüfen, wurde in der vorliegenden Arbeit eine Gruppe von Patienten mit verschiedenen Leukämieformen untersucht. Daneben wurden Versuche über den Einfluß der Farbstoffkonzentration auf das Färbeergebnis angestellt. Ober die klinische Wertigkeit der Ergebnisse wird diskutiert.

1.1 Material und Methode

Für alle Untersuchungen wurde frisches Venenblut zunächst in EDTA-Röhrchen überführt. Aufgrund früherer Untersuchungen war bekannt, daß gute Färbeergebnisse nur zu erzielen sind, wenn die Färbung innerhalb längstens vier Stunden nach Blutabnahme erfolgt. Um störende Einflüsse auf das Untersuchungsergebnis gering zu halten, wurde bei dieser Untersuchung eine Zeitspanne von höchstens zwei Stunden zwischen Gewinnung und Färbung eingehalten. 18 Blutproben wurden mit jeweils drei verschiedenen Konzentrationen (c_1, c_2, c_3) von Pseudoisocyaninchlorid (im weiteren PIC) gefärbt, die übrigen Blutproben nur mit der Stammlösung (C_1). Diese entspricht einer $5 \cdot 10^{-4}$M PIC-Lösung. c_2 (erhält man durch Mischung eines Teils Lösung c_1 mit einem Teil Aqua bidestillata) entspricht einer $2{,}5 \cdot 10^{-4}$M PIC-Lösung und c_3 (1 Teil Lösung c_1 plus 2 Teile Aqua bidestillata) entspricht einer $1{,}\overline{66} \cdot 10^{-4}$M PIC-Lösung. Zur Färbung nach den Verfahrensweisen C_1 bis C_3 wurden jeweils 100 µl EDTA-Blut in einem Mikroreaktionsgefäß mit 100 µl der entsprechenden Farbstofflösung c_1, c_2 oder c_3 vermischt und für exakt 20 Minuten inkubiert. Anschließend wurde in der üblichen Weise je ein Ausstrich angefertigt, getrocknet und innerhalb von 6 Stunden ausgewertet.

Bei den Patienten mit myeloischen Leukämien wurde eine weitere Untersuchung durchgeführt: Hierfür wurden 200 µl EDTA-Blut in einem Mikroreaktionsgefäß mit 5 µl Chloroform versetzt und für 30 Sekunden in einem Rotationsmischer (Eppendorf 3300) inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurden 200 µl PIC-Stammlösung dazupipettiert und für 20 Minuten gefärbt. Danach erfolgte das Anfertigen der Ausstriche. Wegen der besonderen Affinität von PIC zu anionischen Substanzen ist die Färbung vom pH-Wert abhängig (20). Dieser hält sich bei allen oben beschriebenen Verfahrensweisen annähernd im Neutralbereich. Unter Berücksichtigung ihrer begrenzten Haltbarkeit sollte die PIC-Lösung monatlich erneuert werden.
Zur Auswertung diente ein Fluoreszenzmikroskop "Ortholux II" von Leitz mit einem Ölimmersionsobjektiv 100/1,30. Die Präparate wurden in Auflichtfluoreszenz mit einer Xenon Hochdrucklampe 75 in Verbindung mit einem Blauerregerfilter BG 12 (Leitz) und einem Sperrfilter TG 510 (Leitz) untersucht. Photographische Aufnahmen erfolgten mit Ektachrome Highspeed (Kunstlicht), bei einer Belichtungszeit von 18-20 Sekunden.

1.2 Beschreibung der Granulozyten und mononukleären Zellen beim Gesunden

Färbt man EDTA-Blut mit $5 \cdot 10^{-4}$M PIC-Lösung, ergeben sich teilweise umgekehrte Verhältnisse wie bei der üblichen Pappenheim-Färbung:

Die neutrophilen Granulozyten weisen bei der PIC-Färbung keine typischen Granula auf. Nur vereinzelt findet man schlierenhafte, meist längliche fluoreszenzverdichtete Stellen. Der Zellkern ist scharf vom Zytoplasma abgegrenzt, er fluoresziert grün bis gelb. Nur nach zusätzlicher Inkubation des Blutes mit einem Lipidlöser (z.B. Chloroform, wie in Absatz 1.1 beschrieben) erscheinen zahlreiche leuchtend-gelbe intrazytoplasmatische Granula, welche in Größe, Form und Verteilung an die namengebenden Granula bei der Pappenheim-Färbung erinnern.

Vakuolen imponieren durch ihre meist kreisrunde Form und tiefschwarze Farbe. Die Untergrundfluoreszenz des Zellplasmas wechselt zwischen grauen und grünlichen Farbtönen.

Bei den eosinophilen Granulozyten finden sich viele Vakuolen, welche in Größe und Form den roten Granula bei der Pappenheim-Färbung entsprechen. Zwischen diesen lassen sich immer einige gelbe und grüne Granula nachweisen. Der Kern fluoresziert wie bei den neutrophilen Gra-

nulozyten grün bis gelb.

Im Gegensatz dazu sind die basophilen Granulozyten dicht mit gelben, runden Granula bepackt.

Lymphozyten haben einen grün bis gelb fluoreszierenden Kern, der vom schwach grünlichen Zytoplasma scharf abgegrenzt erscheint. Ober das Zytoplasma verteilt zeigen sich mehrere bis viele leuchtend gelbe, mitunter auch gelbgrüne Granula.

Ähnliche Granula finden sich auch in den Monozyten, die sich wie in der Pappenheim-Färbung durch Größe und Kernform von den Lymphozyten unterscheiden. Nach Inkubation des Blutes mit Lipidlösungsmitteln ist ein vollständiger Granulierungsverlust der mononukleären Zellen zu beobachten.

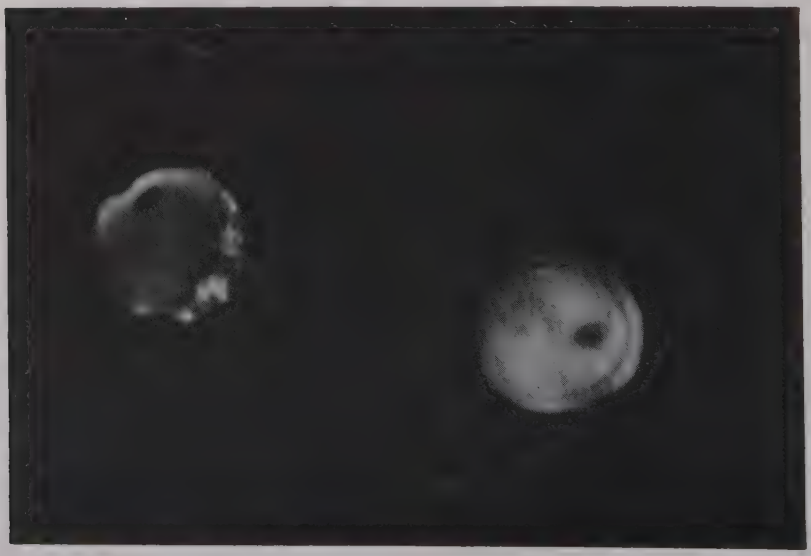

Abb. 1: Granulierter (links) und nicht granulierter Lymphozyt. Peripheres Blut.

2. ERGEBNISSE

2.1 Nach Diagnosen geordnet

2.1.1 Untersuchungen bei Patienten mit chronisch-myeloischer Leukämie

Bei der Auswertung der Präparate bestanden mitunter erhebliche Schwierigkeiten hinsichtlich der Zelldifferenzierung. In der Folge wurde einheitlich festgelegt, in dieser Diagnosengruppe, wie auch bei den im Abschnitt 2.1.3 dargestellten akut-myeloischen Leukämien, jeweils 100 mononukleäre, rundkernige Zellen, also Lymphozyten, Monozyten und Granulozytenvorstufen zu zählen und bezüglich ihres Granulierungsgrades in x, y und z einzuordnen. x bedeutet eindeutig granuliert. y repräsentiert die Klasse der nicht eindeutigen Fälle. Diese wurde probeweise eingeführt, sie hat sich aber nur für die Beurteilung des Verdünnungsversuchs als sinnvoll erwiesen und wurde in neueren Untersuchungen wieder aufgegeben. Die hierzu gerechneten Zellen besaßen zwar keine typischen Granula, hatten aber Zonen mit schlieriger, stellenweise verdichteter Fluoreszenz. z heißt eindeutig nicht granulierte Zelle.

Tabelle 1: Chronisch-myeloische Leukämie

Nr.	Alter / Geschlecht	Medikation	Klinische Besonderheiten	% bei PIC-Konz. c_1		
				x	y	z
1	27 männlich	Prednison	Ø	91	0	9
2	47 männlich	Myleran	Ø	92	0	8
3	39 männlich	Ø	akuter Schub	79	0	21
4	73 weiblich	Ø	fraglicher Übergang in Blastenschub	79	3	18
5	41 männlich	Myleran	Ø	35	14	51
6	61 weiblich	Ø	Ø	49	1	50

2.1.2 Untersuchungen bei Patienten mit chronisch-lymphatischer Leukämie

Hierbei wurden je Präparat 100 Lymphozyten gezählt und den Kategorien x, y oder z zugeordnet.

Tabelle 2: Chronisch-lymphatische Leukämie

Nr.	Alter Geschlecht	Medikation	Bemerkungen	% bei PIC-Konz.c_1 x	y	z
1	46 männl.	Antibiotika	27000 Leukoz.	100	0	0
2	52 männl.	Endoxan, Vincristin, Prednison	Ø	97	0	3
3	70 männl.	Endoxan, Vincristin, Prednison	4800 Leukoz.	99	0	1
4	75 männl.	Ø	Ø	100	0	0
5	62 männl.	Ø	56600 Leukoz.	98	0	2
6	62 männl.	Endoxan, Vincristin, Prednison	312000 Leukoz.	98	0	2
7	74 männl.	Ø	3300 Leukoz.	85	3	12
8	74 weibl.	2Ery-Konzentrate, Prednison	Ø	99	0	1
9	66 weibl.	Ø	Ø	96	0	4
10	62 männl.	Ø	100000 Leukoz.	98	0	2
11	56 männl.	Ø	Z.n.Splenekt.	88	6	6
12	67 weibl.	Ø	36000 Leukoz.	96	0	4
3^+	70 männl.	Ø	Ø	89	3	8
8^+	74 weibl.	Ø	70000 Leukoz.	99	0	1

Nummer mit + bedeutet: Untersuchung bei diesem Patienten wurde zu einem späteren Zeitpunkt wiederholt.

2.1.3 Untersuchungen bei Patienten mit akut-myeloischer Leukämie

In dem hier folgenden handelt es sich um Zellen der in Abschnitt 2.1.1 festgelegten Gruppe.

Tabelle 3: Akut-myeloische Leukämie

Nr.	Alter Geschlecht	Medikation	Bemerkungen	% bei PIC-Konz.c_1 x	y	z
1	38 männl.	ø	14000 Leukoz.	94	0	6
2	16 männl.	Vincristin, Adriblastin, Alexan	7400 Leukoz. i.Kn.-M. 30 % Blasten	65	0	35

2.1.4 Untersuchungen bei Patienten mit akut-lymphatischer Leukämie

Der Anteil von x, y und z wurde an jeweils 100 lymphatischen Zellen erhoben (siehe Tabelle 4 auf Seite 11).

Tabelle 4: Akut-lymphatische Leukämie

Nr.	Alter/Geschlecht	Medikation	Bemerkungen	% bei PIC-Konz. c_1		
				x	y	z
1	24 männlich	Adriamycin, MTX, Vincristin, Endoxan, Prednison, Alexan	28000 Leukoz.	98	0	2
2	10 männlich	∅	im Knochenmark z = 10 %	97	0	3
3	14 Monate, weiblich	∅	∅	33	0	67
4	3 männlich	Vincristin, Methylpredn., Asparaginase, Daunoblastin	im Knochenmark z = 9 %	98	0	2
5	12 männlich	∅	90000 Leukoz.	50	0	50
5+	12 männlich	Vincristin, Methylpredn., Asparaginase, Daunoblastin, Endoxan, MTX, Alexan	4500 Leukoz. im Knochenmark: z = 94 % keine Remission erzielbar	32	0	68

2.2 Verdünnungsversuch

Wie bereits im Abschnitt 1.1 erwähnt, wurde ein Teil der Untersuchungen gleichzeitig mit drei verschiedenen Konzentrationen von PIC durchgeführt ($c_1 = 5{,}0 \cdot 10^{-4}$M, $c_2 = 2{,}5 \cdot 10^{-4}$M, $c_3 = 1{,}\overline{66} \cdot 10^{-4}$M). Mittels dieses Experimentes sollte geklärt werden, welche Farbstoffverdünnung die eindeutigsten und damit am leichtesten zu interpretierenden Befunde liefert.

Tabelle 5: Färbeergebnisse bei 3 PIC-Konzentrationen

Nr.	c_1			c_2			c_3		
	x	y	z	x	y	z	x	y	z
1	79	0	21	81	0	19	92	0	8
2	79	3	18	83	6	11	60	17	23
3	35	14	51	22	27	51	40	25	35
4	49	1	50	74	3	23	61	7	32
5	100	0	0	94	4	2	36	54	10
6	97	0	3	99	1	0	37	47	16
7	99	0	1	94	4	2	66	27	7
8	100	0	0	77	17	6	90	9	1
9	98	0	2	98	1	1	92	6	2
10	98	0	2	89	9	2	78	18	4
11	85	3	12	79	4	17	77	7	16
12	99	0	1	66	28	6	39	55	6
13	96	0	4	55	26	19	38	21	41
14	98	0	2	63	20	17	50	30	20
15	88	6	6	82	12	6	59	23	18
16	96	0	4	76	7	17	85	13	2
17	98	0	2	98	2	0	76	17	7
18	94	0	6	50	27	23	87	8	5

2.3 Neutrophile Granulozyten nach Chloroforminkubation

Unter Anwendung der in Abschnitt 1.1 erläuterten Methode, bei welcher die Färbung mit PIC erst nach einer kurzen Kontaktphase mit dem Lipidlöser Chloroform erfolgte, wurde bei den Patienten mit myeloischen Leukämien der Anteil der granulierten Zellen von je hundert neutrophilen Granulozyten ermittelt.

Tabelle 6: Granulozyten bei Chloroform-PIC-Färbung

Nr.	granuliert	nicht granuliert
1	79	21
2	23	77
3	23	77
4	80	20
5	93	7
6	67	33
7	1	99
8	92	8

3. DISKUSSION

3.1 Klinische Wertigkeit

Die Untersuchten mit chronisch-myeloischer Leukämie (n=6) hatten im Mittel ($\bar{x}$) 70,83 % granulierte Zellen, wobei 35 % und 91 % die Extremwerte waren. Somit fand sich bei dieser Diagnosengruppe eine relativ große Spannweite R=56. Zur Interpretation der Werte muß man sich vergegenwärtigen, daß hier nicht eine einzelne Zellpopulation betrachtet wurde, sondern aus Differenzierungsschwierigkeiten Monozyten, Lymphozyten und Granulozytenvorstufen zu einer Gruppe zusammengefaßt wurden. Beim Gesunden sind nach Schöberl (15) Lymphozyten zu mindestens 97 % granuliert. Auch Monozyten und die Vorstufen vom Granulozyten bis zum Myelozyten, wie man aus Knochenmarksuntersuchungen weiß, sind granuliert. Es kann sich also bei den nicht granulierten Zellen sowohl um funktionsgestörte Monozyten, Lymphozyten wie auch um pathologische Granulozytenvorstufen handeln. Für den Fall, daß letztere Zellpopulation das Gros der geschädigten Zellen bei dieser Diagnose ausmacht, was aufgrund der entsprechenden Befunde bei anderen Färbungen möglich erscheint, ist aber der Prozentsatz von ca. 71 % unauffälliger Zellen sicherlich, wegen mitgezählter gesunder Monozyten und Lymphozyten zu hoch.

Dazu stark abweichende Ergebnisse ergab die Untersuchung der Gruppe mit chronisch-lymphatischer Leukämie (n=12). Trotz doppelter Fallzahl war die Spannweite mit R=15 deutlich kleiner. Alle Werte bewegten sich zwischen 85 % und 100 % granulierter Lymphozyten. $\bar{x}$ war 96,16 %, respektive 95,86 %, falls man die beiden Zweituntersuchungen in die Bewertung mit einbezieht. Oberraschenderweise liegt damit der Mittelwert für Patienten mit chronisch-lymphatischer Leukämie nur knapp niedriger als die untere Normgrenze für Gesunde.

Bei den beiden untersuchten Fällen mit akut-myeloischer Leukämie wurden 94 % und 65 % granulierte Mononukleäre gefunden. Hier gilt bezüglich des Prozentsatzes jedoch das oben Gesagte, da wiederum vermutlich gesunde Monozyten und Lymphozyten mitgezählt wurden.

Bei den fünf Fällen mit akut-lymphatischer Leukämie fällt noch deutlicher als in der zuvor besprochenen Gruppe ein weites Auseinanderklaffen der Werte zwischen 32 % und 98 % granulierter Lymphozyten auf. Auf die Berechnung eines Mittelwertes wurde wegen der großen Spannweite (R=66) bei einer kleinen Fallzahl (n=5, plus eine Zweituntersuchung) verzichtet. Zwei vergleichbare, von Schöberl (15) untersuchte Fälle mit dieser Diagnose zeigten mit 0 % und 99 % diese Auffächerung noch deutlicher. Suschke (19) beschreibt dazu vier Fälle mit Granulierungsgraden zwischen 5 % und 100 %. Möglicherweise hat die starke Unter-

schiedlichkeit der Befunde ihre Ursache in der Uneinheitlichkeit, der unter dieser Diagnose subsumierten Erkrankungen. Trifft dies zu, so wäre eine weitere Aufgliederung dieser Gruppe wünschenswert. Sie birgt andererseits den Nachteil in sich, daß damit die Anzahl der Fälle pro Untergruppe noch kleiner würde und die Möglichkeit, statistische Aussagen zu treffen, sich noch schwieriger gestaltete. Ein ganz anderer Ansatz, die starke Divergenz der Befunde zu erklären, liegt darin, das Ausmaß der Granulierung für eine eher unspezifische Erscheinung zu halten. Dieser Gedanke wird an späterer Stelle eingehend erörtert.

Bezüglich der Altersverteilung der leukämischen Erkrankungen stehen die Befunde im Einklang mit den Angaben in einschlägigen Publikationen (3, 10, 17). So ist das Durchschnittsalter der Patienten mit chronisch-myeloischer Leukämie 48 Jahre (Median $\tilde{x}$=44 Jahre). Bei den an chronisch-lymphatischer Leukämie Erkrankten war das Altersmittel 64 Jahre (der Median ebenfalls 64 Jahre). Auf Aussagen zur Gruppe der akut-myeloischen Leukämien wird wegen der kleinen Fallzahl (n=2) verzichtet. Die Patienten mit akut-lymphatischer Leukämie hatten ein Durchschnittsalter von 10 Jahren ($\tilde{x}$=3 Jahre).

Um einen spezifischen Effekt des Lebensalters auf den Granulierungsgrad der mononukleären Zellen auszuschließen, mußte, da neben dem Alter auch der Prozentsatz der Gra-

nulierung von Gruppe zu Gruppe unterschiedlich war, die Untersuchung auf Altersabhängigkeit nach Diagnosen getrennt durchgeführt werden. Die Prüfung ergab bei den chronisch-myeloischen Leukämien einen für kleine Stichprobenumfänge korrigierten Korrelationskoeffizienten (r*) von -0,21 (zwischen den Parametern Lebensalter und Prozentsatz der Granulierten). Bei den chronisch-lymphatischen Leukämien war r* = - 0,11. Entsprechende Berechnungen zu den beiden verbleibenden Gruppen waren aufgrund der kleinen Fallzahl nicht sinnvoll. Nach Definition des Korrelationskoeffizienten (14, 21) bedeutet eine Annäherung von r (bzw. r*) an plus oder minus eins eine enge Abhängigkeit der beiden Parameter voneinander. Nähert sich r Null an, so bedeutet das Unabhängigkeit. Daraus folgert für die vorliegende Untersuchung, daß, wenn überhaupt, nur ein sehr lockerer Zusammenhang zwischen dem Lebensalter und der Granulierung bestehen kann.

Die Geschlechtsverteilung im Untersuchungsgut (190 ♂ : 60 ♀) zeigt, wie auch von Hegglin u.a. (3, 10, 17) festgestellt wurde, eine deutliche Männerwendigkeit der Leukosen. Bei den Frauen bewegte sich der Prozentsatz der granulierten Zellen zwischen 33 % und 99 %, bei den Männern zwischen 32 % und 100 %. Ein geschlechtsspezifischer Unterschied ließ sich nicht beobachten.

Therapie mit Zytostatika dürfte allenfalls einen geringen Einfluß auf den Grad der Granulierung haben. Von 8

Patienten unter zytostatischer Therapie wiesen 5 normale Granulierungsgrade, also 97 % oder mehr auf. Von den 17 anderen fand sich bei 6 Untersuchten ein Normalbefund, zwei verfehlten diese Grenze mit 96 % nur knapp. Der Unterschied zwischen unbehandelten Patienten und solchen mit Behandlung ist somit nicht ausreichend groß, um einen positiven Effekt der Zytostatikatherapie auf die Anzahl der granulierten Zellen zu beweisen. Alle Patienten waren am Tag der Blutentnahme fieberfrei. Ein Zusammenhang des Granulierungsgrades mit der Körpertemperatur ist folglich nicht anzunehmen.

3.2 Die Auswirkungen verschiedender PIC-Konzentrationen auf das Zählergebnis

Das Ziel dieses Teils der vorliegenden Arbeit war es, diejenige Verdünnungsstufe von PIC zu ermitteln, welche die klarsten Ergebnisse für die Beurteilung der Granulierung liefert. Für diese Aufgabenstellung erschienen zunächst zwei unterschiedliche Wege gangbar. Der eine wäre gewesen, eine Gruppe von Personen mit Leukämien und ein Vergleichskollektiv Gesunder nach der dargestellten Methode mit mehreren Verdünnungsstufen zu untersuchen, um dann vergleichend diejenige Farbstoffverdünnung zu finden, bei der im Mittel der relative Unterschied im Gra-

nulierungsgrad zwischen Gesunden und Kranken am größten ist. Um mit diesem Verfahren zum Ziel zu gelangen, bedürfte es einer großen Anzahl von Untersuchungen, weswegen man sich hier für den anderen Weg entschieden hat. Indem neben den Klassen der granulierten und der ungranulierten Zellen auch noch eine dritte Klasse (y) für nicht eindeutig einzuordnende Zellen geschaffen wurde, hatte man damit quasi ein Maß für die Unschärfe der jeweiligen Verdünnungsstufe. Ist innerhalb einer Konzentration die Besetzungszahl für die Klasse y groß, so bedeutet es, daß der so verdünnte Farbstoff ein schwer beurteilbares Resultat liefert. Ist die Summe aller y klein, dann bestanden bei der betrachteten Konzentration offensichtlich kaum Zweifel hinsichtlich der Zuordnung der Zellen zu den Klassen x und z. Aus der Tabelle 5 ergibt sich für die Konzentration c_1 (= $5 \cdot 10^{-4}$M) eine Besetzungssumme der Klasse y von 27, für c_2 (= $2{,}5 \cdot 10^{-4}$M) war y = 198 und für c_3 : y = 384. In der Abbildung 2 ist die Besetzung der Klasse y in Abhängigkeit von der Farbstoffkonzentration ($c_1 c_2 c_3$) graphisch dargestellt. Die durchgezogenen Linien verbinden die Werte je eines Falls. Die fettgedruckte, unterbrochene Linie verbindet die Mittelwerte.

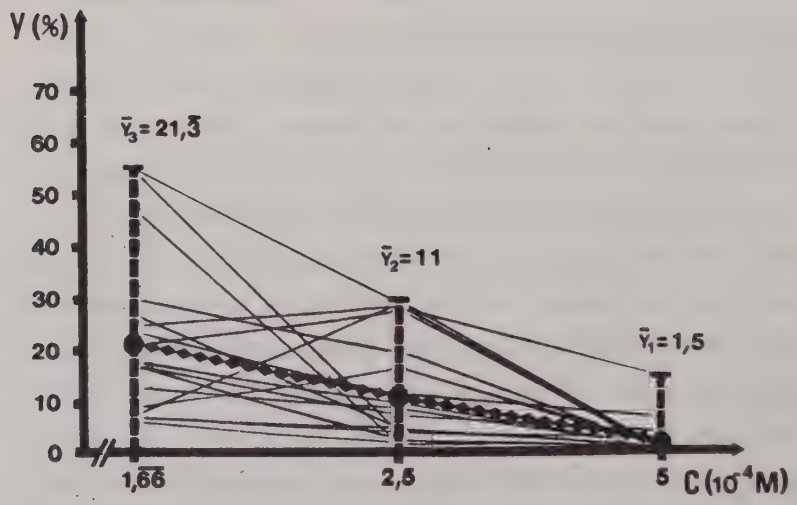

Abbildung 2: Abhängigkeit y von c

Damit war eindeutig entschieden, daß

1. die Stammlösung von PIC die besten Ergebnisse zu liefern imstande ist und
2. mit abnehmender Konzentration von PIC die Beurteilbarkeit des Färbeergebnisses zunehmend schlechter wird.

Inwieweit die Möglichkeit bestünde, mit noch höheren Konzentrationen des Farbstoffes als $5 \cdot 10^{-4}$M die Eindeutigkeit des Ergebnisses weiter zu steigern, muß offen bleiben,

da PIC nicht in höheren Konzentrationen erhältlich war. Bei immerhin 13 von 18 untersuchten Fällen war die Klasse y unter Verwendung der PIC-Konzentration c_1 unbesetzt geblieben und somit die Eindeutigkeit nicht mehr zu steigern. Für weitere Untersuchungen mit PIC erscheint folglich die Konzentration c_1 als ausreichend und empfehlenswert.

3.3 Chloroform

Bei der kombinierten Färbung mit Chloroform und PIC wurde das Färbeverhalten von neutrophilen Granulozyten bei myeloischen Leukämien untersucht. Die Ergebnisse zeigten eine breite Auffächerung zwischen 1 % und 93 % granulierte Zellen. Gesunde neutrophile Zellen zeigen bei dieser Färbung intrazytoplasmatische Granula, welche in Größe, Form und Verteilung an die namengebenden Granula in neutrophilen Granulozyten bei der Pappenheimschen Färbung erinnern. Ohne Behandlung des Blutes mit Chloroform läßt sich keine Granulierung beobachten. Ein analoges Ergebnis kann man allerdings auch nach Inkubation mit anderen Lipidlösungsmitteln, wie z.B. Benzol, erreichen. Vermutlich wird hierbei durch Einwirken des Lipidlösers die Struktur der Zellmembran und damit ihre Bindung mit dem Farbstoff verändert. Die schlierenhaften, meist länglichen fluoreszenzverdichteten Stellen der Granulozytenmembran

verschwinden ganz. Eine weitere Auswirkung der Änderung der Membranstruktur betrifft die Permeabilität, so daß es den Farbstoffmolekülen möglich wird, in die Zelle einzudringen und sich an intrazytoplasmatische Gebilde mit polyanionischer Matrix anzulagern. Als solche kommen beispielsweise in Lipidmicellen liegende saure Proteasen, also Lysosomen in Frage. Was aber bedeutet für die Zelle der Verlust der Granulierung? Interessanterweise zeigen Granulozyten bei Patienten mit septischen Zuständen beziehungsweise Granulozyten aus Eiter auch bei Patienten ohne hämatologische Erkrankungen zu einem unterschiedlich großen Anteil Degranulation. Der Granulationsverlust ist demnach ein unspezifischer Befund, für dessen Erklärung mehrere Mechanismen in Frage kommen:

1. Degranulierte Zellen gaben ihre Lysosomen nach außen ab, im Sinne einer umgekehrten Endozytose, wie sie etwa bei Cottier (5) beschrieben ist: Ein Lysosom und eine phagozytierte Kaveole verschmelzen, lagern sich an die Zytoplasmamembran und werden, unter Eingliederung der beteiligten Membrananteile in die Zellmembran, nach außen abgegeben, oder

2. degranuliert erscheinende Granulozyten besitzen aufgrund eines Defektes keine oder solcherart veränderte Lysosomen, daß sie sich bei der hier benutzten Fär-

bung nicht darstellen. In Analogie zu den Ergebnissen bei lymphatischen Leukämien (19), sind demzufolge ungranulierte Zellen vermutlich identisch mit malignen Zellen.

Beide Erklärungsversuche erscheinen prinzipiell möglich. Aber es lassen sich auch leicht Gegenargumente finden:

Zu 1:

Bei diesem Mechanismus ist eine kontrollierte, selektive Enzymfreisetzung notwendig, da anderenfalls mit der Möglichkeit der Zellschädigung gerechnet werden muß. Außerdem wäre eine gleichzeitige lokale Protonenfreisetzung zu fordern, um die Funktionsfähigkeit der Enzyme zu gewährleisten (9). Im Zusammenhang mit der umgekehrten Endozytose sind vermehrte Zelluntergänge festzustellen (5). Folglich könnte der Verlust der Granula auch als unspezifische Reaktion im Vorfeld des Zelltods aufgefaßt werden. Aber niedrige Granulierungsgrade sind nicht mit einem Absinken der Leukozytenzahl korreliert.

Zu 2:

Eine einfache Gleichsetzung degranulierter Zellen mit malignen Zellen ist unzulässig, da unter bestimmten Umständen auch bei anderen als hämatologischen Erkrankungen Degranulation auftritt.

Faßt man nun die obigen Aussagen zusammen, so zeigt sich, daß der Granulationsverlust keine einheitliche Ursache hat. Bei unterschiedlichen Erkrankungen kommen dafür unterschiedliche Mechanismen in Betracht.
Maligne Zellen sind angesichts der vorliegenden Untersuchungsergebnisse wohl häufig nicht granuliert. Übereinstimmend damit wissen wir einen Funktionsverlust als ein charakteristisches Merkmal für Malignität zu werten. Andererseits ist nicht jede degranulierte beziehungsweise funktionsgestörte Zelle eine maligne und nicht unbedingt jede maligne Zelle zeigt bei der PIC-Färbung einen Granulaverlust.
Eine genauere Kenntnis darüber, unter welchen Umständen Granulozyten ihre Granula verlieren, könnte ein Untersuchung erbringen, die das Färbeverhalten von Granulozyten bei Gesunden mit dem von Patienten mit hochfieberhaften Erkrankungen vergleicht.

3.4 Oberflächenveränderungen bei mononukleären Zellen

PIC ist ein metachromatischer Farbstoff, d.h. er ändert bei Bindung an bestimmte Gewebe - sogenannte Chromotrope - sein Absorptionsspektrum. Alle natürlichen Chromotrope sind in wässriger Lösung negativ geladen und haben ein relativ hohes Molekulargewicht. Für die Granulierung der

mononukleären Zellen sind Phospholipide in der Zellmembran verantwortlich (15). Die Unterschiede in der Ausprägung der Fluoreszenz, also Granulation oder keine Granulation, korrelieren eng mit der Konzentration der membranständigen Phospholipide. Für die vorliegende Arbeit bedeutet dies, daß offensichtlich ein Konzentrationsunterschied bezüglich der Phospholipide zwischen gesunden und kranken Zellen besteht. Um welchen Anteil der Phospholipide es sich dabei letztlich handelt, bleibt weiterhin ungeklärt. Nach Befunden von Gottfried (7) und Zwingelstein (23) nimmt bei malignen Zellen der Phosphatidylcholin-Gehalt der Zellmembran zu; Sphingomyelin und Phosphatidyläthanolamin sind im Vergleich mit Normalzellen erniedrigt. Das Verhalten der anderen Phospholipide, wie z.B. Phosphatidylserin und Phosphatidylinositol ist für eine verläßliche Aussage zur Zeit noch zu wenig untersucht. Da sich die Zellen bei malignen hämatologischen Erkrankungen durch einen erniedrigten Granulationsgrad auszeichnen, darf davon ausgegangen werden, daß eher solche Phospholipide für die Granulierung ursächlich sind, die bei malignen Zellen reduziert sind. Um welche Komponenten es sich dabei handelt, wäre im Rahmen zukünftiger biochemischer Forschungsarbeiten zu klären.

Für das Proliferationsverhalten von Zellen scheint die Viskosität der Zellmembran mitverantwortlich zu sein. Die Zellmembran maligner Zellen ist weniger viskös (7,

12, 16, 23). Die Viskosität hängt unter anderem vom Verhältnis zwischen neutralen und geladenen Lipiden in der Bilayerschicht ab, dem Quotienten zwischen Cholesterin und Phospholipiden. Die Membranviskosität steigt mit dem Cholesteringehalt. Obereinstimmend damit ist der Cholesteringehalt maligner Zellen erniedrigt, der Phospholipidegehalt insgesamt erhöht.

Inkubiert man mononukleäre Zellen Gesunder mit Lipidlösungsmitteln, so verlieren sie ihre Granulierung und ähneln dann funktionsgestörten Zellen bei malignen hämatologischen Erkrankungen. Diese Beobachtung legt Spekulationen über einen Zusammenhang solcher Lipidlöser mit der Leukämieentstehung nahe.

Chloroform ist schon seit längerem als Induktor für Hepatome bekannt (5). Inwieweit dabei seine Eigenschaft als Zellmembran schädigender Lipidlöser pathogenetisch verantwortlich ist, bleibt unklar. Eine Rolle als Leukämieinduktor wurde ihm bislang nicht zugeschrieben. Mit Sicherheit läßt sich sagen, daß die bei der hier angewendeten Färbung eingesetzten Konzentrationen von Chloroform sehr viel höher sind als etwa solche, die für eine chronische Exposition des Menschen mit diesem Stoff zu veranschlagen sind.

Etwas anders verhält es sich bei Benzol. Dieser Stoff wurde schon vor ca. einhundert Jahren mit Leukämieentstehung in Verbindung gebracht (18). Jedoch konnten bis-

her nur Häufungen von akuten Leukämieformen neben präleukämischen Zuständen und aplastischen Knochenmarkssyndromen beobachtet werden (1, 4, 18). Die chronischen Leukämien verlaufen demzufolge nach einem anderen pathogenetischen Prinzip. Dennoch zeigen auch sie eine Häufung von degranulierten mononukleären Zellen.

Das oben bezüglich der Konzentration und Einwirkzeit von Chloroform Gesagte trifft genauso für Benzol zu.

Bei einer kritischen Wertung aller Fakten erscheint kein Zusammenhang zwischen der Fluoreszenzlöschung nach Lipidlöserinkubation und der Degranulierung bei Leukämien vorzuliegen.

Der Granulaverlust nach Lipidlöserbehandlung dürfte seine Ursache im Verlust von zellmembranständigen Phospholipiden infolge eines Auswascheffekts haben. Daraus kann jedoch nicht mit Sicherheit auf einen entsprechenden Mangel eines bestimmten Phospholipidanteils der Zellmembran leukämischer Zellen geschlossen werden, da auch noch andere Faktoren am Auftreten der Fluoreszenz bei der benutzten Färbung beteiligt sind. So ist zum Beispiel der Abstand, den die Farbstoffmoleküle voneinander bei der Anlagerung an polyanionische Matrizen einnehmen, nicht unerheblich, denn nur ab einer gewissen Annäherung können die π-Elektronensysteme der Farbstoffmoleküle in Wechselwirkung treten.

Die Anlagerung selbst wiederum ist abhängig von der ste-

rischen Anordnung der negativ geladenen Gruppen in der polyanionischen Matrix (8). Darüber, ob man eine Granulierung beobachten kann, entscheidet also nicht nur das Vorhandensein des entsprechenden Phospholipids in der Zellmembran, sondern auch mehrere andere Parameter. Als solche sind in diesem Zusammenhang die Beweglichkeit der negativen Ladungen im Molekülverband und lokale Konzentrationsunterschiede der Matrix interessant - Eigenschaften, welche eng mit der quantitativen Zusammensetzung und Struktur der Zellmembran verknüpft sind.
Außer bei Kontakt mit Chloroform und Benzol, die an der Zellmembran über eine Erniedrigung der Viskosität und gleichzeitige Erhöhung der Permeabilität angreifen sollen (13), wurden auch bei therapeutischen Einsätzen von Phenylbutazon Degranulierungen mononukleärer Zellen berichtet (2). Altbekannten Hinweisen auf eine carcinogene Wirkung von Phenylbutazon geht Friedman (6) in einer sehr sorgfältigen Untersuchung auf den Grund. Dabei kommt er zu dem Schluß, daß ein kausaler Zusammenhang zwischen Leukämien und Phenylbutazontherapie durch die bisher gemachten Untersuchungen nicht belegbar ist. Es bestehen jedoch kaum mehr Zweifel an der Verknüpfung von Leukämien mit rheumatoiden Erkrankungen. Als Deutung dieser Tatsache bieten sich allerdings mehrere Möglichkeiten an:

1. Für beide Erkrankungen besteht eine gemeinsache Ursache.

2. Eine rheumatoide Erkrankung stellt einen Risikofaktor für die Leukämieentstehung dar.

3. Eine rheumatoide Erkrankung ist als unspezifisches Frühsymptom für eine Leukämie zu deuten.

4. Bei rheumatoiden Erkrankungen eingesetzte Medikamente induzieren Leukämien.

Welcher dieser Mechanismen das statistisch belegte, gehäufte gemeinsame Auftreten von rheumatoiden Erkrankungen und Leukämien bewirkt, kann anhand der bisher angestrengten Untersuchungen nicht entschieden werden.

Abschließend läßt sich sagen, daß für den Granulaverlust wohl mehrere Ursachen gleichzeitig vorliegen. Das Granulierungsverhalten stellt also einen unspezifischen Befund dar, der keine eindeutige Aussage über seine Genese zuläßt. Möglicherweise stehen die beobachteten Veränderungen mit dem Zelltod in Zusammenhang. Für ein besseres Verständnis spielen zukünftige Untersuchungen von Struktur, Zusammensetzung und Funktion der Zellmembran eine zentrale Rolle.

ZUSAMMENFASSUNG

Bei der beschriebenen Färbemethode mit PIC weisen mononukleäre Zellen Leukämiekranker im Vergleich zu Gesunden verminderte Granulierungsgrade auf. Der prozentuale Anteil der granulierten Zellen hängt von der Leukämieform ab, nicht aber vom Alter, Geschlecht oder der verabreichten Therapie. Die chronischen Leukämieformen weisen dabei hinsichtlich der Granulierung mononukleärer Zellen eine homogenere Struktur auf als die akuten Leukosen. Bei der chronisch-lymphatischen Leukämie erreicht der durchschnittliche Granulierungsgrad fast die Norm.

Mittels spezieller Untersuchungen konnte die optimale Farbstoffkonzentration ermittelt werden.
Oberlegungen zur Natur der Granula lassen einen Zusammenhang mit dem quantitativen und strukturellen Aufbau der Zellmembran vermuten. Vergleichende Beobachtungen deuten darauf hin, daß der Granulaverlust als ein unspezifischer Befund zu werten ist, der keine sichere Aussage über seine Genese zuläßt.

LITERATURVERZEICHNIS

1) Aksoy M, Erdem S, Dinçol G: Types of leukemia in chronic benzene poisoning. A study in thirty-four patients. Acta Haematol (Basel) 55 (2): 65-72, 1976

2) Baretzky E: Diss. LMU München. Bisher unveröffentlicht.

3) Begemann u.a.: Klinische Hämatologie, 2. Aufl. 449-450 Thieme Stuttgart 1975

4) Brandt L, Nilsson PG, Mitelman F: Occupational exposure to petroleum products in men with acute non-lymphocytic leukaemia. Br Med J 1 (6112): 553, 1978

5) Cottier H: Pathogenese. Ein Handbuch für die ärztliche Fortbildung. Bd I und Bd II. Springer New York 1980

6) Friedman GD: Phenylbutazon, musculoskeletal disease, and leukemia. J Chronic Dis 35 (4): 233-43, 1982

7) Gottfried EL: Lipid patterns of leukocytes in health and disease. Semin Hematol 9:241-250, 1972

8) Gschwind K: Zur Struktur von Pseudoisocyanin-Aggregaten. Diss. TU München 1974

9) Henson PM: Mechanisms of exocytosis in phagocytic inflammatory cells. Am J Pathol 101 (3): 494-511, 1980 Parke Davis Award Lecture

10) Herold G u.a.: Innere Medizin. Herold Köln 1983

11) Huisman CH, van der Wielen AW, ten Thij AC: Incidence of leukemia. Lancet 21; 1 (8221): 673, 1981

12) Petitou M, Tuy F, Rosenfeld C, Mishal Z, Paintraud M, Jasnin C, Mathe G, Inbar M: Decreased microviscosity of membrane lipids in leukemic cells: two possible mechanism. Proc Natl Acad Sci USA 75 (5): 2306-2310, 1978

13) Reyes J u.a.: Effects of anaesthetics bencyl alcohol and chloroform on bilayers made from monolayers. Biophys J 28 (2): 259-279, 1979

14) Sachs L: Statistische Methoden, 4. Aufl. Springer New York 1979

15) Schöberl H: Färbeverhalten mit Pseudoisocyaninchlorid von Leukozyten bei Normalpersonen und Patienten mit leukämischen Erkrankungen. Diss. LMU München 1982

16) Shinitzky M, Inbar M: Difference in microviscosity induced by different cholesterol levels in the surface membrane lipid layer of normal lymphocytes

and malignant lymphoma cells. J Mol Biol 85: 603-615, 1974

17) Siegenthaler W, Hegglin R: Differentialdiagnose innerer Krankheiten, 13. Aufl. Thieme Stuttgart 1975

18) Stobbe H: Risikofaktor Benzol Arch Geschwulstforsch 51 (7): 575-578, 1981

19) Suschke H, Bender-Götze C, Fink U, Ledderose G, Rüter M, Schöberl H: Unterscheidung leukämischer und nicht leukämischer Zellen im Blutausstrich durch Fluoreszenzfärbung mit Pseudoisocyanin. Monatsschr Kinderheilk 130: 858-859, 1982

20) Suschke H, Gschwind K, Rode: Fluroeszenzmikroskopischer Nachweis saurer Mucopolysaccaride in menschlichen Blut- und Knochenmarkszellen. Klin Wochenschr 54 (6): 289-290, 1976

21) Oberla K: Biomathematik. Erläuterungen und Lernhilfen zum Gegenstandskatalog. Oberla München 1975

22) Vlodavsky J, Sachs L: Difference in the cellular cholesterol to phospholipid ratio in normal lymphocytes and lymphocytic leukaemic cells. Nature 250: 67-68, 1974

23) Zwingelstein G, Tapiero H, Portoukalian J, Fourcade A: Changes in phospholipid and fatty acid composition in differentiated Friend leukaemic cells. Biochem Biophys Res Commun 98 (2): 349-358, 1981

L E B E N S L A U F

Am 31. Januar 1957 wurde ich in Geisenfeld/Obb. als dritter Sohn des Allgemeinarztes Dr. Lorenz Eberle und seiner Frau Erna, geb. Huber, geboren.

Von 1963 bis 1967 besuchte ich die Volksschule in Geisenfeld, anschließend den mathematisch-naturwissenschaftlichen Zweig des Christoph-Scheiner-Gymnasiums in Ingolstadt.

Nach dem Abitur 1976 arbeitete ich im Rahmen des Zivildienstes im Krankenhaus Geisenfeld bis zu meiner Beurlaubung zum Zwecke des Medizinstudiums. Im Sommer 1977 begann ich mit dem Studium der Medizin an der Universität München, das ich mit dem Staatsexamen im Sommer 1983 abschloß. Am 20. Juni 1983 wurde mir die Approbation als Arzt erteilt. Vom September 1983 bis Januar 1984 war ich am Kuratorium für Heimdialysen und am Klinikum Ingolstadt in der Nephrologie als Arzt tätig. Seit Februar 1984 bin ich im Max von Pettenkofer-Institut der Universität München angestellt. Die Arbeiten zu dieser Dissertation nahm ich im Dezember 1981 an der Kinderpoliklinik der Universität München auf.

Seit Mai 1982 bin ich verheiratet und lebe in München.